

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

C12Q 1/68

## [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00114997.0

[43] 公开日 2001 年 9 月 26 日

[11] 公开号 CN 1314494A

[22] 申请日 2000.3.20 [21] 申请号 00114997.0

[71] 申请人 上海博德基因开发有限公司

地址 200092 上海市中山北二路 1111 号 3 号楼 12 层

[72] 发明人 毛裕民 谢毅 李瑶

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图页数 0 页

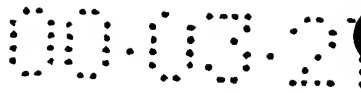
[54] 发明名称 一种基因芯片荧光标记物的洗涤方法及其专用洗脱液

[57] 摘要

本发明提供了一种基因芯片荧光标记物的洗脱方法和专用于该方法的洗脱液,找出了一种很适合洗脱 Cy3 的一种溶剂-Tween20,其分子量与 Cy3 的相当,Cy3 能溶解于 Tween-20 中,能随着溶剂洗脱出来,而不会结合在玻片上干扰信号。同时,将温度提高到 50℃-60℃,这样能更有效的去除一些杂质和一些非特异性结合,完全保证除去杂交背景,分析结果更好。

BEST AVAILABLE COPY

4 7 2 4 - 8 0 0 1 N S S I



## 权 利 要 求 书

1、一种基因芯片杂交后荧光标记物 Cy3、Cy5 的洗涤方法，其特征在于，(1) 将洗脱温度提高到 50-60℃；(2) 选择聚氧乙烯山梨醇酐单月桂酸脂 作为洗脱液。对杂交后玻片的具体操作过程如下：

5      ①1×SSC + 0.2%SDS 于 50℃-60℃浸洗 10-15 分钟左右. ②1×SSC + (0.1%-2%) Tween20 于 50℃-60℃浸洗 10-15 分钟左右. ③0.1×SSC + 0.2%SDS 于室温浸洗 10-15 分钟左右. ④ddH<sub>2</sub>O 于室温浸洗 2-4 分钟左右. ⑤晾干, 扫描.

2、如权利要求 1 所述的荧光标记物 Cy3、Cy5 的洗涤方法，其最适条件为：

10      将杂交后玻片在①1×SSC + 0.2%SDS 于 60℃浸洗 10 分钟，再②1×SSC + 0.2%Tween20 于 60℃浸洗 10 分钟，再③0.1×SSC + 0.2%SDS 于室温浸洗 10 分钟，再④ddH<sub>2</sub>O 于室温浸洗 3 分钟，最后⑤晾干, 扫描。

3、一种专用于权利要求 1 或 2 所述方法的洗脱液，其特征是在现有的洗脱液中加入 0.1%-2%聚氧乙烯山梨醇酐单月桂酸脂。

# 说明书

## 一种基因芯片荧光标记物的洗涤方法及其专用洗脱液

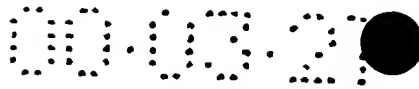
5 本发明属于基因技术领域，涉及基因芯片技术，尤其涉及一种基因芯片杂交后荧光标记物 Cy3、Cy5 的洗涤方法及其专用的洗脱液。

基因芯片是九十年代发展起来的一项前沿生物技术。随着生物技术的迅猛发展，20 世纪人类最宏伟的计划之一——人类基因组计划预计将提前至 2003 年完成  
10 共计 30 亿对碱基的序列测定，以及小鼠、果蝇、线虫等模式生物的全基因组序列的测定。人类基因组计划将由此进入后基因组时代，研究的重点将由发现基因转向发现基因的功能。人们将逐步阐明从基因到蛋白再到生命现象这一过程的奥秘。如何大规模研究人类约 10 万条基因的功能，特别是基因相互作用和调控关系，迫切需要一种新的方法能以大规模、高通量的方式进行成千上万个基因在各种生理  
15 状态下表达状况的研究。传统的 Northern blot 杂交或点杂交方法，以及以电泳为基础的基因表达、序列测定、突变和多态性分析等研究方法显然不能适应上述的要求。基因芯片技术由此应运而生。

将大量的靶基因片段有序地、高密度地（点与点之间的距离一般小于 500 $\mu$ m）排列在玻璃、硅等载体上，称之为基因芯片，也叫基因微矩阵（Microarray）。基  
20 因芯片可以用荧光检测和计算机软件进行数据的比较和分析，以达到快速、高效、高通量地分析生物信息的目的。

基因芯片的概念可追溯到 southern blot 杂交技术，即 DNA-DNA 之间通过碱基配对机制形成互补链。随后又发展出 northern blot 杂交和点杂交技术。这三种技术都是将核酸样品固定在滤膜上，样品容易扩散，因此在单位面积上点样的密度受到限制，无法进行大规模、高通量的 DNA 杂交。同时，由于滤膜面积较  
25 大而需较多探针量，检测灵敏度较低。为了提高点样密度和检测灵敏度，降低探针用量，以玻璃、硅等材料为载体的基因芯片技术逐步得到了发展。

美国affymetrix公司于二十世纪八十年代末至90年代初，率先开展了这方面的研究(Fodor, S.P.A. et al. (1991) Science 251, 767-773.)。1992年，该



公司运用半导体照相平板技术，在 $1\text{cm}^2$ 左右的玻片上原位合成寡聚核苷酸片段，诞生了世界上第一块基因芯片(Southern, E., Maskos, U. & Elder, R. (1992) Genomics 13, 1008-1017.)。同时，探针的荧光标记，激光共聚焦扫描(U.S Patent 5981965)和计算机分析(U.S Patent 5974164)等技术也随之发展。1995年，第  
5 一块以玻璃为载体的基因芯片(微矩阵)在美国Stanford大学诞生(Schena, M. 等(1995) Science. 270. (20): 467-480.)，这标志着基因芯片技术步入了广泛研究和应用的时期。

原位合成寡聚核苷酸芯片具有密集程度高，可合成任意序列的寡聚核苷酸等优点，适用于DNA序列测定、SNP分析等。但其缺点是合成寡聚核苷酸长度  
10 有限，因而基因特异性差，而且随长度的增加合成错误率随之增高，作为基因表达谱研究远不如cDNA芯片。cDNA芯片是将微量cDNA片段在玻璃等载体上按矩阵密集排列并固化，也叫微矩阵(Microarray)(DeRisi, J. 等(1997) Science 278, 680-686.)。基因点样密度虽不及原位合成寡聚核苷酸芯片高，但比用传统载体，如混合纤维素滤膜或尼龙膜的点样密度要高得多，可达到每张载玻片  
15 4万个基因。而cDNA芯片最大的优点是靶基因检测特异性非常好，用作表达谱研究结果可靠。目前许多国家实验室和大制药公司都用此类芯片(Baldwin, D 等(1999) Curr Opin Plant Biol 2 (2):96-103.)。

有鉴于基因芯片具有高通量、高信息量、快速、样品用量少、造价低、用途广泛等优点，目前世界上许多国家和地区都已着手进行基因芯片的研制和开发工  
20 作。美国政府于1998年正式启动基因芯片计划，NIH、能源部、商业部、司法部、国防部、中央情报局等均参与了此项目。同时斯坦福大学、麻省理工学院及部分国立实验室如Argonne, Oakridge也参与了该项目的研究和开发。英国剑桥大学、欧亚公司也正在从事该领域的研究。世界大型制药公司尤其对基因芯片技术用于基因多态性、疾病相关性、基因药物开发和合成或天然药物筛选等领域感兴趣，  
25 都已建立了或正在建立自己的芯片设备和技术。

基因芯片围绕一系列的点样、标记、杂交、扫描等步骤进行的，其中芯片杂交后的洗涤这一步骤至关重要。洗涤是指将非特异性结合在基因芯片玻片上的标记物去掉，而与固定在玻片上的靶基因形成配对的探针仍保留其上。在基因芯片技术中，最常用的荧光标记物是Cy3、Cy5，并且经常同时使用。洗涤关系到芯片  
30 扫描的效果，直接影响前面所有的实验步骤，洗涤效果的好坏关系对整个实验的成

败起到举足轻重的作用。然而很多人往往很容易会忽略这一看似不太重要的步骤,结果可想而知,既浪费了人力,物力又让费了大量的时间. 现有的相关处理方法包括:

- (1)杂交完后在室温(25℃)在低严格性的 Wash buffer(1×SSC 和 0.1%SDS)浸洗 5 分钟后,然后在室温用高严格性的 Wash buffer(0.1×SSC 和 0.1%SDS)浸洗 5 分钟,再用 0.1×SSC 洗涤。
- (2) 2×SSC, 0.1%SDS 室温浸洗 2-3 分钟,然后分别用 1×SSC 和 0.1×SSC 浸洗 5 分钟 .
- (3)5×SSC, 0.1%SDS 室温浸洗 5 分钟, 0.2×SSC 和 0.1%SDS 室温浸洗 5 分钟。( Shalon, D. Genome Research, 639-645, 1996.)
- (4)杂交完后在室温(25℃)在低严格性的 Wash buffer(1×SSC 和 0.1%SDS)浸洗 5min 后,然后在室温用高严格性的 Wash buffer(0.1×SSC 和 0.1%SDS)浸洗 10 分钟。( Schena, M. PNAS. USA, 93:10614-10619, 1996 )
- (5) 2×SSC, 0.2%SDS 室温浸洗 5 分钟, 0.05×SSC 室温浸洗 1 分钟。( l DeRisi, J. Science, 270:680-686, 1997.)
- (6) 2×SSC, 0.2%SDS 室温浸洗 5 分钟, 0.1×SSC 室温浸洗 10 分钟。( Zhang L, Science, 1997, 276:1268-1272)
- (7) 2×SSC, 0.1%SDS 室温浸洗 10 分钟, 0.2×SSC 室温浸洗 5 分钟, ddH<sub>2</sub>O 浸洗 0.5 分钟,在暗盒中自然干燥( Welford S M, Nucleic Acids Research, 1998, 26 (12) :3059-3065)

以上几种现有方法,没有很大区别,这些方法不能完全保证除去杂交背景,影响到分析结果.其原因在于:

1. 温度较低, 非特异性杂交背景很强;
2. SDS 对 Cy3 的去除效果不理想。

本发明的目的在于公开一种消除杂交背景及降低交叉杂交的洗涤方法。

发明的构思的构思是这样的:

- 常规的洗涤方法存在着缺陷,背景污染仍较严重,对扫描结果产生极大的干扰,容易造成假象,这其中主要是一些未杂交上的荧光标记物 Cy3、Cy5 非特异性吸附所造成。现有的洗涤方法中尤其对 Cy3 的洗涤效果很差,其在 SDS 溶液中很难洗

脱, 主要问题是 SDS 的分子量与 Cy3 的分子量相差较大, SDS 难以将其洗脱, 影响扫描效果。我们依据分子量的大小及温度高低并根据基因芯片技术的要求, 找出一种适合洗脱 Cy3 的一种溶剂—Tween20, 其分子量与 Cy3 的相当, Cy3 能溶解于 Tween-20 中, 能随着溶剂洗脱出来, 而不会结合在玻片上干扰信号。同时, 我们将

5 温度提高到 60℃, 这样能更有效地去除一些杂质和一些非特异性结合。

本发明亦是这样实现的:

在基因芯片杂交后的洗涤过程中, 我们对常规方法进行了两个方面的改进:

1. 将洗脱温度提高到 50-60℃;
- 10 2. 选择聚氧乙烯山梨醇酐单月桂酸脂(俗称 Tween20)作为洗脱液。

对杂交后玻片的具体操作过程如下:

①1×SSC + 0.2%SDS 于 50℃-60℃浸洗 10-15 分钟左右. ②1×SSC + 0.2%Tween20 于 50℃-60℃浸洗 10-15 分钟左右. ③0.1×SSC + 0.2%SDS 于室温浸洗 10-15 分钟左右. ④ddH<sub>2</sub>O 于室温浸洗 2-4 分钟左右. ⑤晾干, 扫描。

15

以下将通过实施例对本发明的有关细节作进一步的阐述, 但实施例并不限制本发明的保护范围, 有关的技术人员完全可以根据本发明的构思和所公开的技术方案, 举一反三地应用于基因芯片杂交后荧光标记物 Cy3、Cy5 的洗涤, 这也在本发明的保护范围之内。

20

#### 实施例 1 制备肝炎系列诊断芯片

当芯片与标记的样本杂交后, 取出杂交后玻片, 立即放入盛有 ddH<sub>2</sub>O 的烧杯中, 使盖玻片自然脱落。

- 准备三个染色缸和一个烧杯, 分别装有 1×SSC+0.2%SDS, 1×SSC+0.2% Tween-20 和 0.1×SSC+0.2%SDS, 放入 60℃水浴锅中。
- 25

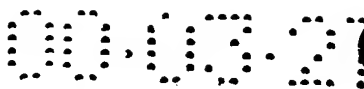
将玻片依次浸入以上三个染色缸和一个烧杯中, 各洗涤 10 分钟。

再将玻片浸入装有 ddH<sub>2</sub>O 的烧杯中洗涤 3 分钟。

取出洗涤后的玻片, 正面朝下, 3000rpm 离心 1 分钟, 等玻片干燥后即可进行扫描。

30

根据本说明书所公开的技术方案和实施例, 将本发明和常规方法进行比较, 洗涤玻片后经 ScanArray 3000 扫描仪扫描后, 观察结果, 并重复多次实验, 证明



上述方法有如下几个优点：

①根据相似相溶原理，针对 Cy3 的分子量我们选用了 Tween20 来洗脱，效果非常好，而 SDS 又有利于洗脱 Cy5。

②提高洗脱温度到 50-60℃可以有效去除非特异性杂交背景。

5      ③对杂交信号几乎无影响。

DELPHION

BEST AVAILABLE COPY

51457-2002700-10361



Log Out

Work Files

Saved Searches

RESEARCH

PRODUCTS

INSIDE DELPHION

My Account

Search: Quick/Number Boolean Advanced Derwent

Help

The Delphion Integrated View: INPADOC Record

Get Now: ☒ PDF | [More choices...](#)

Tools: Add to Work File: 

Create new Work File

 Add

View: Jump to: 

Top

 Go to: [Derwent](#)

☒ Email this to a friend

Title: CN1314494A: WASHING METHOD FOR FLUORESCENT LABEL OF GENE CHIP AND ITS SPECIAL ELUTION LIQUID

Derwent Title: Washing method for fluorescent label of gene chip and its special elution liquid [Derwent Record]

Country: CN China  
Kind: A Unexamined APPLIC. open to Public inspection  
Inventor: YUMIN MAO; China  
YI XIE; China  
YAO LI; China

Assignee: BODE GENE DEVELOPMENT CO., LTD., SHANGHAI China  
[News, Profiles, Stocks and More about this company](#)

Published / Filed: 2001-09-26 / 2000-03-20

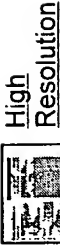
Application Number: CN20000000114997

IPC Code: C12Q 1/68;

ECLA Code: None

Priority Number: 2000-03- CN20000000114997

Abstract: The proper Cy3 eluting liquid is solvent Tween 20, which has the molecular weight about equal to that of Cy3 and can dissolve Cy3. Cy3 may be eluted out with the solvent without combining to glass plate and producing interference signal. The washing temperature is raised to 50-60 deg.c and this can eliminate impurity, some non-specific combination and hybrid background to result in correct analysis.





Family:

PDF	Publication	Pub. Date	Filed	Title
<input checked="" type="checkbox"/>	CN1314494A	2001-09-26	2000-03-20	WASHING METHOD FOR FLUORESCENT LABEL OF GENE CHIP AND ITS SPECIAL ELUTION LIQUID
1 family members shown above				

Other Abstract

Info:



Nominate this for the Gallery...



Copyright © 1997-2005 The Thomson Corporation  
[Subscriptions](#) | [Web Seminars](#) | [Privacy](#) | [Terms & Conditions](#) | [Site Map](#) | [Contact Us](#) | [Help](#)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**